

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 12 年度博士課程 進学  
氏 名 大沢 勇久  
指導教官名 大坪 栄一

### 論文題目 イネのレトロポゾン *p-SINE1* の転写とその産物の解析

レトロエレメントは、その転写産物が逆転写されたのち転移する因子であり、真核生物ゲノムの重要な構成要素である。レトロエレメントの一種 SINE (Short INterspersed Element) は、他の多くのレトロエレメントと異なり、RNA ポリメラーゼ III (Pol III) によって転写され、自身の転移に必要なタンパク質をコードしないレトロポゾンである。イネの *p-SINE1* は、栽培稲 *Oryza sativa* の *Waxy* 遺伝子のイントロンへの挿入配列として、当研究室で植物で最初に発見された SINE であり、*O. sativa* のハプロイドゲノム当たり約 6500 コピー存在する。ゲノム上に存在する *p-SINE1* の解析から、そのコンセンサス配列は 122 bp のサイズでその内部に Pol III のプロモーター様配列を持ち、3' 末端にポリ T が存在することが明らかにされている。本研究は *p-SINE1* の転写とその産物を解析することにより、*p-SINE1* が自身の持つ Pol III のプロモーターで転写されること、その発現が DNA メチル化などで制御されていること、および *O. sativa* とその近縁種で特定のサブグループの *p-SINE1* メンバーが主に転写されていること、を明らかにしたものである。また、そのサブグループの *p-SINE1* メンバーの多くは比較的最近に転移したものであることから、その転写産物の高次構造を明らかにすることで、*p-SINE1* の転移に必要な構造を推定したものである。

#### 1. イネ培養細胞における *p-SINE1* の転写

*O. sativa* の懸濁培養細胞 Oc より抽出した全 RNA について、*p-SINE1* 配列をプローブとしてノーザン解析を行ったところ、*p-SINE1* 配列の大きさとはほぼ一致する低分子量の RNA を検出した。このことから、*p-SINE1* がイネ細胞中で発現していることが示唆された。5' RACE-PCR により *p-SINE1* 配列を含む転写産物の 5' 端領域をクローニングしてその配列を調べたところ、*p-SINE1* 配列の 5' 端付近から始まるものに加え

て、*p-SINE1* 配列の 5' 端の上流の隣接領域から始まるものも存在することが分かった。そこで、Oc 細胞の全 RNA から 300 nt 以下の低分子量の RNA を分画し、この標品を用いて 5' RACE-PCR により解析したところ、ほとんどの転写産物が *p-SINE1* 配列の 5' 端付近から始まるものであることが分かった。これらの結果は、見いだされた低分子量の RNA が *p-SINE1* 転写産物であり、*p-SINE1* 配列の 5' 端付近から転写されたものであることを示す。また、*p-SINE1* 配列内部にハイブリダイズするプライマーを用い、全 RNA を鋳型としてプライマー伸長反応を行ったところ、*p-SINE1* 配列の 5' 端付近で伸長が止まった産物が生じることが分かった。これは *p-SINE1* 配列の 5' 端付近から転写されるという 5' RACE-PCR の結果を確認するものである。また、C-RACE 法により *p-SINE1* 転写産物の 3' 端領域の配列を調べたところ、*p-SINE1* 配列の 3' 端にあるポリ U で終わるものが多いことが分かった。これは、*p-SINE1* の転写が、*p-SINE1* 配列の 3' 端に存在するポリ T で終わることを示す。*p-SINE1* 配列の内部には Pol III のプロモーター様配列があり、ポリ T は Pol III の転写終結シグナルであることから、*p-SINE1* は Pol III により転写されその産物を生じることが示唆された。

5' RACE-PCR と C-RACE で得られた *p-SINE1* の転写産物の中には、ゲノム上に存在する *p-SINE1* メンバーの解析から得られたコンセンサス配列と較べ異なる 6 つの塩基置換を同じ位置に持つものが高い割合 (62.5 %) で存在することが分かった。これらの塩基置換は *O. sativa* の系統間で挿入の有無の多型を示す *p-SINE1* のサブファミリー RA (Recently Amplified) 中のひとつのサブグループ (RA $\alpha$  と呼ぶ) のメンバーが持つ塩基置換と一致するものであった。これは RA サブファミリーに属する比較的最近に転移した *p-SINE1* メンバーが主に発現していることを示す。

*p-SINE1* が Pol III によって転写されていることをさらに確かめるため、タバコの核抽出物を用いて RNA ポリメラーゼ II の阻害剤の存在下で *p-SINE1* 配列を運ぶプラスミド DNA を鋳型として *in vitro* 転写を行った。その産物を電気泳動したところ、*p-SINE1* 配列の 5' 端付近から始まる転写産物が生じていることがわかった。この転写産物は、Pol III のプロモーター様配列に変異を入れた *p-SINE1* 配列を運ぶプラスミド DNA を鋳型とした場合には生じなかった。この結果は、*p-SINE1* が Pol III によって転写されていることを確認するものである。

## 2. DNA メチル化阻害剤の存在下と熱ストレス下での *p-SINE1* の転写

レトロエレメントの多くは DNA メチル化によるエピジェネティックな発現抑制を受けている。そこで、*p-SINE1* の発現がメチル化により抑制されるかどうか調べるために、DNA メチル化阻害剤 (5-アザシチジン) 処理した Oc 細胞から RNA を抽出し、ノーザン法で解析した。その結果、*p-SINE1* 転写産物の量が 5-アザシチジン処理によって顕著に増大することがわかった。これは、*p-SINE1* の発現が DNA メチル化によって抑制されていることを強く示唆する。5-アザシチジン処理した細胞中の *p-SINE1* 転写産物を 5' RACE-PCR 及び C-RACE により調べたところ、無処理の場合と同様、RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* メンバーに特徴的な塩基置換を有するものが大部分であった。この結果は、RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* メンバーの発現が DNA メチル化によって

抑制されていることを示す。さらに RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* メンバーの配列が実際にメチル化されているかどうかを明らかにするために、Oc 細胞ゲノム中の *p-SINE1* メンバーの配列におけるメチル化部位を bisulfite genomic sequencing 法によって調べたところ、その内部のメチル化ターゲット配列である CG または CNG 配列のシトシン残基が強くメチル化されていること、5-アザシチジン処理によりそのメチル化の程度が下がること、がわかった。これは、DNA メチル化が *p-SINE1* の発現抑制に関与するという上記の結果を支持するものである。

動物の SINE では細胞への熱ストレスにより転写産物量が増大することが知られている。そこで *p-SINE1* の転写に熱ストレスが与える影響を調べるため、熱ショック処理した Oc 細胞中から全 RNA を抽出し *p-SINE1* 転写産物をノーザン法により解析した。その結果、*p-SINE1* の転写産物量は動物の SINE の場合とは異なり、減少することがわかった。熱ショック処理した Oc 細胞中の *p-SINE1* 転写産物を 5' RACE-PCR によって調べたところ、無処理の場合と同様、RA $\alpha$  サブグループに特異的な塩基置換を持つものが大部分であった。これは、RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* メンバーとそれ以外のメンバーのいずれの転写産物の量も熱ストレスにより減少することを示唆する。

### 3. 植物体での *p-SINE1* の転写

*O. sativa* (日本晴) の植物体の各器官より抽出した全 RNA を用いて、ノーザン解析により *p-SINE1* の発現を調べた。その結果、根と穂において *p-SINE1* の転写産物が検出されたが、葉では検出されなかった。これは、*p-SINE1* が植物体のいくつかの組織に特異的に発現していることを示す。穂の生殖細胞で *p-SINE1* が転移した場合、その新たに転移したメンバーは種子を経て次世代に遺伝するため、穂における転写産物を調べることは *p-SINE1* の転写と転移の関係を明らかにする上で重要であると考えられる。穂の細胞における *p-SINE1* 転写産物を 5' RACE-PCR によって調べたところ、培養細胞と同様、RA $\alpha$  サブグループに特異的な塩基置換を持つものが大部分であった。これは、組織に関わらず *O. sativa* の細胞では RA $\alpha$  の *p-SINE1* メンバーが主に転写されていることを示唆する。

次に RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* メンバーが *O. sativa* に近縁の種の系統でも転写されているかどうかを明らかにするために *O. sativa* と同じ AA ゲノムを持つ四つの種 (*O. rufipogon*, *O. barthii*, *O. glaberrima* 及び *O. longistaminata*) の系統の穂の細胞中の *p-SINE1* 転写産物を 5' RACE-PCR によって解析した。生じた PCR 産物をクローニングし塩基配列を調べたところ、RA $\alpha$  サブグループに特異的な塩基置換を持つものが大部分であることがわかった。これは、RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* メンバーが AA ゲノムを持つ近縁種でも主として転写されていることを示すものであり、このことは AA ゲノムの祖先種において既にそれらが転写されるようになっていたことを示唆する。

### 4. *p-SINE1* 転写産物の二次構造

*p-SINE1* 転写産物は、その転移に必要な逆転写酵素などのタンパク質と相互作用

すると考えられる。これらのタンパク質は *p-SINE1* 転写産物の高次構造を認識し作用していることが予想される。そこで RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* メンバーの転写産物がどのような高次構造を取っているのか、その構造が他の *p-SINE1* メンバーのものとのような違いがあるのか、を明らかにするために、まず RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* の転写産物とコンセンサス配列を持つ *p-SINE1* の転写産物をそれぞれ合成し、それらを非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。その結果、RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* 転写産物は1本のバンドとして現れたのに対し、コンセンサス配列を持つ *p-SINE1* 転写産物は複数のバンドとして現れた。この結果は RA $\alpha$  サブグループ *p-SINE1* 転写産物がコンセンサス配列を持つものとは異なり単一の高次構造を取るとを示唆している。また、これらの *p-SINE1* 転写産物を温度勾配 (10 から 50°C) 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析したところ、RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* 転写産物は温度変化に関わらず、単一のバンドとして現れた。これは、その高次構造が温度変化に関して安定であることを示唆している。

RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* 転写産物の実際の高次構造を推定するため、まず RNA の二次構造をコンピュータープログラム mfold によって調べた。その結果、5' 側の領域と 3' 側の領域においてそれぞれステム-ループ構造を取ることが予測された。次に、RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* 転写産物を、一本鎖 RNA の特異的塩基または二本鎖 RNA を切断する各種 RNase で処理し、その切断箇所を解析することによって二次構造を調べた。その結果、*p-SINE1* の 5' 側領域の mfold によって予測されたステム-ループ構造が存在することが示唆された。

以上、本研究はイネのレトロポゾン *p-SINE1* が Pol III によって転写されること、*p-SINE1* には RA $\alpha$  というサブグループが存在し、イネにおいて AA ゲノムを持つ色々な種の系統で発現していることを明らかにした。また、*p-SINE1* の発現が DNA のメチル化によって抑制されていること、熱ストレスによって転写産物量が減少するような制御を受けていること、を明らかにした。さらに RA $\alpha$  サブグループの *p-SINE1* 転写産物の二次構造を明らかにした。この構造は転移に必要な逆転写酵素などの認識に関与している可能性が示唆される。これらの結果は、これまで全く解明されていなかった植物の SINE の転写とその制御や転写産物の二次構造を明らかにしたものである。